

**Der Kohlenhydratstoffwechsel
im Hafer**

Jürgen Berndt

1961

DER KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL
IM HAFER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Jürgen Berndt
aus
Lübeck

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 6. 1961



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG , Ziel der Arbeit	1
Bisherige Arbeiten über die im Hafer vorkommenden Kohlenhydrate	4
DIE FRUKTOSANE AUS JUNGEM HA FER	
Das Ausgangsmaterial	6
Trennungsversuch mit der Kohle-Celite-Säule	7
Trennungsversuch mit der Grycksbo-Säule	9
Trennung der Oligosaccharide auf Papierbögen	10
Neokestose, Kestose und Bifurkose	11
Die Bedeutung der Neokestose. Die Neobifurkose	13
DIE FRUKTOSANE AUS ÄLTEREM HA FER	
Das Ausgangsmaterial	16
Mono- und Disaccharide	16
Trennung der höheren Fruktosane mit der Kohle-Celite-Säule	16
Die 36 Fraktionen	20
Die Methylierung der Fraktionen 12 - 30	21
Folgerungen aus dem Ergebnis der Methylierung	21
Die Tetramethylfraktion	24
Versuch zum Nachweis der Mannose	25
Die Neokestose als Baustein der höheren Fruktosane	25
Das Avenarin und Aigilopsin sowie eine höhere Fraktion aus jungem Hafer	26
DISKUSSION	
Zusammenfassung	31
EXPERIMENTELLER TEIL	
LITERATURVERZEICHNIS	
LEBENS LAUF	

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Hans Heinrich Schlubach in der Zeit von Juni 1959 bis Dezember 1960 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Hans-Heinrich Schlubach möchte ich an dieser Stelle für das große Interesse, das er jederzeit für meine Arbeit zeigte, sowie für die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen sehr herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt, Direktor des Instituts für Physiologische Chemie der Universität München, bin ich für die gastliche Aufnahme in seinem Institut besonders dankbar.

EINLEITUNG

Die Synthese von Kohlenhydraten in der Pflanze aus Wasser und Kohlensäure unter der katalytischen Mitwirkung von Chlorophyll ist einer der wichtigsten Vorgänge in der Natur. Infolge dieser ihrer großen Bedeutung sind die Kohlenhydrate schon früh Gegenstand sehr intensiver Forschung gewesen. Die Struktur der einfachen monomolekularen Zucker konnte schon verhältnismäßig früh mit chemischen Methoden geklärt werden, Schwierigkeiten ergaben sich jedoch bei den Oligo- und Polysacchariden. Da infolge ihrer großen Ähnlichkeit im physikalischen und chemischen Verhalten eine Trennung der Komponenten fast unmöglich war, gelang es im allgemeinen nicht, einheitliche Verbindungen zu isolieren. In den vergangenen Jahren wurde jedoch durch die selektive Desorption eine Methode eingeführt, mit deren Hilfe es möglich war, auch in der Chemie der Kohlenhydrate große Fortschritte zu erzielen. Aufbau von Stärke und Cellulose konnten so weitgehend geklärt werden (1, 2).

Den nur aus Glukose aufgebauten Reservekohlenhydraten - Stärke und Glykogen - kommt in der Menge ihrer Erzeugung die Stoffklasse der Polyfruktosane im Pflanzenreich gleich. In ihnen sind, wie in der Saccharose, die Fruktosereste in der Furanoseform enthalten.

Der Anbau von Getreide und Weidengräsern ist eine Folge der Erkenntnis der entscheidenden Bedeutung der Reservekohlenhydrate für die menschliche und tierische Ernährung. In zahlreichen Arbeiten haben W.N. Haworth, R. Montgomery, H.H. Schlubach u.a. (3, 4, 5-19) Untersuchungen über den Bau der Polyfruktosane (zunächst der Gräser, später auch der Getreide) angestellt.

Dabei konnte bei den Gräsern (5) ein einheitliches Bauprinzip festgestellt werden. Es liegen unverzweigte Kettenmolekeln vor, in denen die Fruktoseeinheiten derart miteinander verbunden sind, daß das Kohlenstoffatom 2 der einen Fruktose mit dem C-Atom 6 des nächsten Fruktoserestes verbunden ist. Nach dieser in den Gräsern (*Phleum pratense*) (5, 7) aufgefundenen Bindungsart spricht man bei der 2-6-Bindung vom Phleintyp.

Es werden auf diese Weise polymerhomologe Reihen mit einer Kettenlänge bis zu 50 Fruktoseeinheiten wie z.B. in *Lolium perenne* (5) gebildet, wobei eine direkte Proportionalität der Drehung von der Molekülgröße festzustellen ist. Die Bildung dieser unverzweigten Ketten erfolgt durch Transfruktosidierung entweder auf der Fruktosehälfte der Saccharose, in der Weise, daß die erste Molekül dieser Kette Glukose ist (Gl-Fr-Fr-), oder auf eine, bisher noch nicht isolierte Difruktose, wobei glukosefreie Ketten entstehen (Fr-Fr-Fr-). Beide Bautypen kommen nebeneinander vor, die letzten aber im allgemeinen nur in untergeordnetem Maße, wie von H.H. Schlubach und Mitarb. nachgewiesen werden konnte (11, 12).

In den Getreidearten sind die Verhältnisse komplizierter. Neben einer stärkeren Verzweigung und einem geringeren Polymerisationsgrad als bei den Gräsern tritt hier neben dem Phleintyp noch eine weitere Bindungsart auf. Die Fruktosemoleküle können auch in der 1-2-Bindung miteinander verknüpft sein, wie zuerst im Inulin nachgewiesen wurde (13, 14). Diese Bindungsart bezeichnet man daher als Inulintyp. Diese beiden Bindungstypen werden in den Roggenhalmen gleichzeitig angetroffen (16), wo deutlich ausgeprägt zwei polymerhomologe Reihen mit Inulin und Phleinbindung nebeneinander vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit der Transfruktosidierung, die jedoch nur in geringem Maße auftritt, konnte von H.H. Schlubach und F. Lederer (15) festgestellt werden. Eine Anlagerung von Fruktosylresten tritt hier neben der bereits genannten auf der Fruktosehälfte der Saccharose und der Difruktose, auf der Glukosehälfte der Saccharose ein, wobei als erstes Trisaccharid Neokestose (Fr-Gl-Fr) gebildet wird. Die Saccharose kann also zweifach als Acceptor dienen, indem Homologe der Kestose (Gl1-2Fr6-2Fr) bzw. Isokestose (Gl1-2Fr1-2Fr) - Kettenverlängerung auf der Fruktosehälfte der Saccharose, oder solche der Neokestose (Fr2-1Gl6-2Fr) - Kettenverlängerung auf der Glukosehälfte der Saccharose - gebildet werden.

Eine früheren Unterscheidung, daß in den Polyfruktosanen der Ähren der Inulintyp, in denen der Halme der Phleintyp bevorzugt verwirklicht wird, hat sich als unhaltbar erwiesen. H.H. Schlubach und E. Haberland (17) konnten in der Gerste sowohl in den Ähren als auch in den Halmen das dem Inulintyp zugehörige Kritesin nachweisen. Von denselben Autoren (18) konnte aus den Roggenähren neben dem zum Inulintyp gehörenden

Graminin ein Polyfruktosan vom Phleintyp, das Graminin B, isoliert werden.

Durch die Arbeiten von H.H. Schlubach und Mitarbeitern über den Roggen (16) und Weizen (15) ist es mit Hilfe der selektiven Desorption von Kohlensäulen nach R.L. Whistler und D.F. Durso (20) möglich geworden, erstmals die Gesamtheit der in diesen Getreidearten vorkommenden Kohlenhydraten zu erfassen und damit ihre Biogenese zu klären.

So lag es nahe, den Kohlenhydratstoffwechsel des Hafers ebenfalls einer solchen Prüfung zu unterziehen, nach Möglichkeit alle darin vorkommenden Kohlenhydrate zu erfassen, deren Konstitutionen zu bestimmen und daraus ihre Biogenese zu rekonstruieren.

Bisherige Arbeiten über die im Hafer vorkommenden Kohlenhydrate

Bereits 1878 beobachtete A. Müntz (21), daß im milchreifen Roggenkorn eine Verbindung enthalten ist, die bei der Hydrolyse überwiegend Fruktose gibt; im Hafer konnte er diese Verbindung nicht nachweisen. Ch. Tanret (22) wies nach, daß im Roggen, Weizen und der Gerste die Stärke von einem Zucker begleitet wird, der hauptsächlich aus Fruktose besteht; auch er konnte aber weder im grünen noch im reifen Hafer ein Fruktosan entdecken.

E. Schulze und S. Frankfurt (23) untersuchten die Verbreitung des Rohrzuckers in den Gräsern und den Getreidearten und trafen im Haferkorn neben Rohrzucker ein Kohlenhydrat an, das in Alkohol schwerer löslich ist; es wurde jedoch nicht weiter untersucht.

In einer kurzen und originellen Arbeit von O. de Rawton (24) wird ein Vanille-Glukosid im Haferkorn dafür verantwortlich gemacht, daß "die Pferde der Hafer sticht". Denselben Effekt erreichen die Pferdehändler der Normandie mit Queckenwurzeln, in denen dasselbe Vanille-Glukosid enthalten sein soll.

E. Schulze (25) isolierte aus grünem Hafer ein Fruktosan mit der Drehung $-31,7^{\circ}$. Der Autor hält es für identisch mit der schon früher im Roggen aufgefundenen "Secalose" (26) mit der Drehung $-28,7^{\circ}$. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Menge des Fruktosans etwa die zwanzigfache derjenigen des Rohrzuckers beträgt.

Sowohl aus grünem Hafer als auch aus Hafer zur Zeit der Ährenbildung haben H. Colin und H. Belval (27) ein Fruktosan isolieren können, ohne es näher zu charakterisieren. Sie stellten jedoch ausdrücklich fest, daß es mit zunehmender Reife des Hafers verschwindet, im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Roggen, Gerste und Weizen, wo zwar eine Abnahme von Fruktosan, aber kein völliges Verschwinden beobachtet wurde. In einer späteren Arbeit von H. Belval (28) wird der schnelle Abbau des Fruktosans im reifenden Hafer noch einmal bestätigt.

Zwei Polysaccharide wurden von D.L. Morris (29) aus Haferkörnern isoliert, von denen der Hauptbestandteil als "Lichenin" identifiziert und das mit nur 1,3 % Vorkommende als ein Araban, also nur aus Arabinose aufgebaut, erkannt wurde.

In neuerer Zeit schließlich wurde von H. Schlubach und H. Müller (30) aus Haferhalmen ein Polyfruktosan durch Alkohol extrahiert und durch Gegenstromverteilung der Acetylverbindung gereinigt. Sie bezeichneten es als "Avenarin", es enthielt 7 Fruktosemolekeln in Phleinbindung und zeigte eine Drehung von -38° . In den Haferähren konnte außerdem von H.H. Schlubach und P. Hausschildt (31) ein Fruktosan aus 5 Fruktoseeinheiten das "Aigilopsin" isoliert werden. Auch diese Verbindung gehört dem Phleintyp an. Für Aigilopsin und Avenarin wurde zunächst eine cyklische Struktur angenommen, diese Annahme wurde jedoch durch die Ergebnisse späterer Arbeiten derselben Autoren nicht bestätigt.

Bei sämtlichen bisher aus Hafer isolierten Kohlenhydraten handelt es sich um ein aus der Vielzahl der vorhandenen Fällungsmethoden dargestelltes Fruktosan, über dessen Einordnung in eine zugehörige Reihe, prozentualen Anteil an der Gesamtmenge und Biogenese keinerlei Aussagen gemacht werden konnten.

Die Frage nach der Gesamtheit der im Hafer vorkommenden Kohlenhydrate blieb bei der Art der bisherigen Arbeiten offen. Eine möglichst weitgehende Klärung dieses Problems war Aufgabe dieser Arbeit.

DIE FRUKTOSANE AUS JUNGEM HAFER

Das Ausgangsmaterial

Am 9. Juni 1960, etwa drei Wochen vor dem Ährenschieben, wurde Hafer geschnitten und gehäckselt; 16 kg Frischsubstanz wurden mit 48 l 60 %igem Alkohol heiß extrahiert. Der auf etwa 2 l eingedampfte Pressaft wurde mit einer Aufschlammung von basischem Bleiacetat enteiweißt, das überschüssige Blei im selben Ansatz mit Dinatriumhydrogenphosphat ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand im Vakuum zum Sirup eingedampft (Versuch 2).

Aus dem dünnen Sirup wurden mit Alkohol die höheren Fruktosane ausgefällt und getrocknet. In den Mutterlaugen befanden sich hauptsächlich die Mono- und Disaccharide.

	Alkoholfällung	Mutterlaugen	Gesamtmenge
	247 g	250 g	477 g
Asche:	13,8 %	25,8 %	
Netto:	214 g	170 g	384 g
Drehung:	+ 4,6 °	+ 8,8 °	

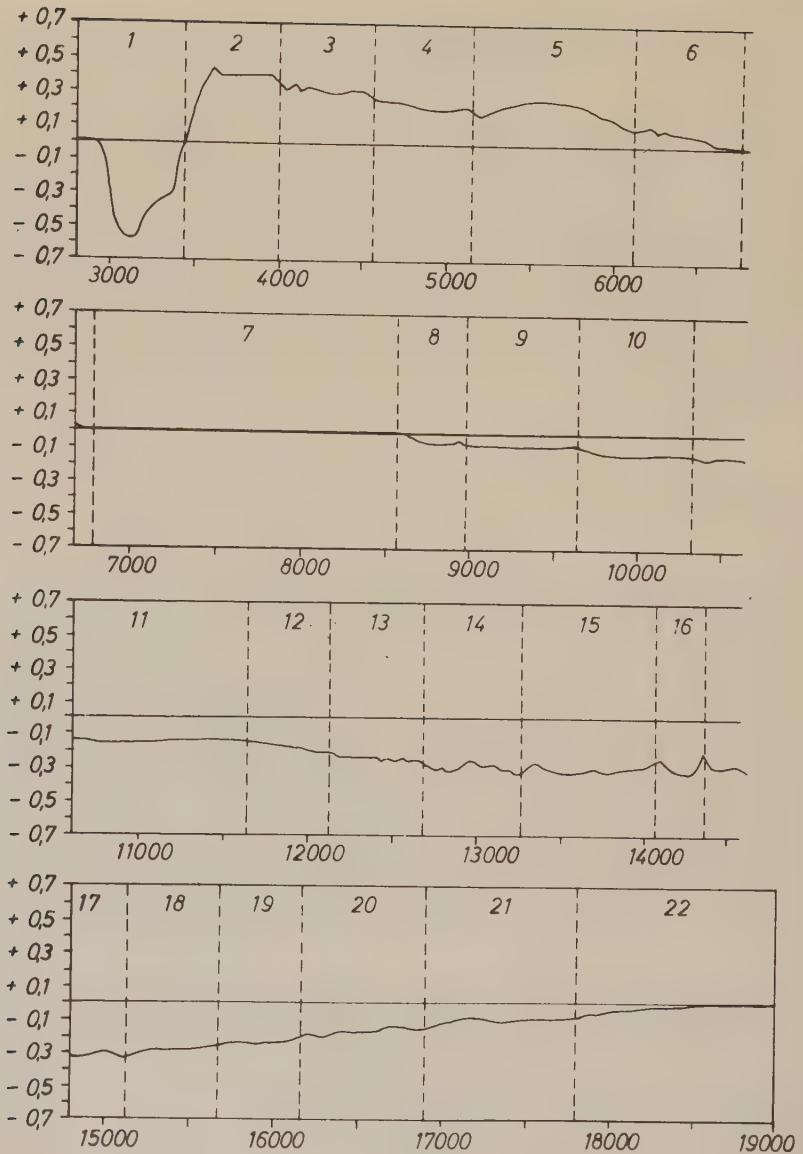
Da sowohl in der Alkoholfällung als auch in den Mutterlaugen im Chromatogramm im System Isopropanol : Butanon : Dimethylformamid : Wasser Flecken auftraten, die von Oligosacchariden herrühren konnten (Versuch 1), wurden Mutterlaugen und Alkoholfällung vereinigt und zur Abtrennung der Hauptmenge von Mono- und Disacchariden auf eine Kohle-Gelite-Säule gegeben (Versuch 3,4).

Mit dest. Wasser wurden die Salze, die Mono- und Disaccharide herausgewaschen, insgesamt 275 g = 72,5 %.

Der Säuleninhalt wurde ausgestoßen, und mit 40 - 60 %igem Alkohol wurden solange die höheren Fruktosane eluiert, bis mit dem Molisch-Reagens kein Zucker mehr nachweisbar war. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurden 87 g = 22,9 % Polysaccharide mit einer Drehung von $-8,5^{\circ}$ erhalten. Die Drehung ließ auf einen verhältnismäßig hohen Anteil an niederen Fruktosanen schließen, da diese positiv drehen. Das Papierchromatogramm im Lösungsmittelgemisch Isopropanol : Methyläthylketon : Dimethylformamid : Wasser (50 : 25 : 5 : 20) (künftig als System I bezeichnet), wie es von H.H. Schlubach und H.O. Koehn (16) mit gutem Erfolg zur Trennung von Oligosacchariden angewandt worden war, zeigte, außer wenig Saccharose, Flecken bei R_s 0,77, 0,54, 0,36 etwa 0,2 außerdem nicht laufende Flecken an der Startlinie. (Saccharose: $R_s = 1,00$)

Trennungsversuch mit der Kohle-Celite-Säule

73,5 g des Fruktosangemisches wurden auf einer Kohle-Celite-Säule (1 : 1) nach dem modifizierten Verfahren von R.L. Whistler und D.F. Durso (20) mit kontinuierlich steigender Alkoholkonzentration der Trennung unterworfen. Das Eluat wurde in Fraktionen zu jeweils 40 - 60 ml in einem Fraktionssammler aufgefangen (Versuch 5). Von jedem der 342 Gläser wurde die Drehung bestimmt und diese gegen die Menge des Eluates aufgetragen, wobei sich folgende Kurve ergab:



Trennungsverlauf der Fruktosane im jungen Hafer
mit steigender Alkoholkonzentration

Ordinate: Drehung α

Abszisse: Menge des ausgelaufenen Eluates in ml

Nach dieser Kurve wurden Fraktionen mit ähnlicher Drehung zu 22 Hauptfraktionen zusammengefaßt. Diese wurden in Vak. bei 30 - 40 ° eingedampft und gewogen.

1.	5,575	13.	2,182
2.	4,304	14.	2,724
3.	3,076	15.	3,112
4.	2,387	16.	1,809
5.	3,621	17.	2,676
6.	1,740	18.	1,309
7.	4,271	19.	1,431
8.	1,000	20.	0,974
9.	2,660	21.	0,833
10.	2,914	22.	0,957
11.	3,373		
12.	1,472		
			54,482 g = 73,2 %

Die Konstitutionsbestimmung nach der Methylierungsmethode der Fraktion 17 wird weiter unten besprochen.

Die papierchromatographische Prüfung der Fraktionen 1 - 3 ergab nur Fruktose und Saccharose; die Fraktionen 4 - 12 hingegen zeigten alle dasselbe Bild: fünf Flecken mit denselben R_f -Werten wie bei der Prüfung des Ausgangsmaterials. Es war lediglich eine teilweise Abtrennung der höher polymerisierten Fruktosane erfolgt, während die Oligosaccharide alle gleichzeitig eluiert worden waren. Die Trennung mit der Kohle-Säule hatte also nicht den gewünschten Erfolg.

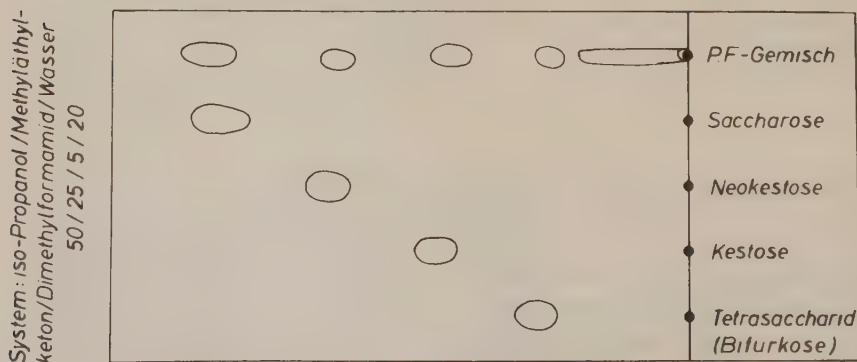
Trennungsversuch mit der Grycksbo-Säule

Da durch die Kohle-Celite-Säule keine Trennung der Oligosaccharide erreicht werden konnte, gleichzeitig aber das Lösungsmittelgemisch Isopropanol : Butanon : Dimethylformamid : Wasser einen so günstigen Trenneffekt auf Papier zeigte, bestand Hoffnung, mit der Grycksbo-Säule eine Trennung der Oligosaccharide zu erreichen, wie dies H.H. Schlubach und H.O. Koehn (16) bei den Oligosacchariden des Roggens so gut gelungen war.

Nach papierchromatographischer Prüfung der ersten aus der Grycksbo-Säule anfallenden Fraktionen zeigte sich jedoch, daß auch hier alle Oligosaccharide gleichzeitig eluiert worden wären; es traten dieselben Flecken auf wie bei dem auf die Säule gegebenen Zuckergemisch. Dieser Mißerfolg ist wahrscheinlich auf das sehr saugfähige Papier der Grycksbo-Säule zurückzuführen. (Versuch 17).

Trennung der Oligosaccharide auf Papierbögen

Das Papier 602 h:p der Firma Schleicher und Schüll in Verbindung mit dem Lösungsmittelgemisch I trennt die Oligosaccharide bis zu Pentasacchariden recht gut. Durch Vorversuche war festgestellt worden, daß eine 5 %ige Lösung der Zucker noch genügend scharf in die einzelnen Komponenten zerlegt wird. Die R_f -Werte der Flecken sind außer Fruktose, Saccharose ($R_s=1,00$) : 0,77, 0,54, 0,35. Auf ganze Bögen wurde daher eine 5 %ige Lösung der Oligosaccharide der Fraktion 5 an der Startlinie in etwa 1/2 - 1 cm breitem Streifen aufgetragen und in obigem Lösungsmittelgemisch chromatographiert. Die Laufzeit betrug 35 - 40 Stunden. Nach dem Trocknen der Bögen wurden zur Lokalisierung der Zucker jeweils Streifen abgeschnitten und nach deren Anfärbung mit Harnstoffreagens die einzelnen Zucker auf den Bögen angezeichnet. Ausgeschnittene Streifen mit denselben R_s -Werten wurden vereinigt und mit Wasser eluiert. (Versuch 6). Aus insgesamt sechs Bögen konnten so drei chromatographisch reine Substanzen gewonnen werden.



Chromatogramm der drei isolierten Zucker, verglichen mit dem Ausgangsgemisch.

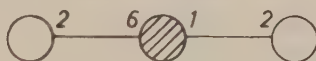
Die analytischen Daten der drei Zucker sind folgende:

I	II	III
59,8 mg	23,7 mg	33,8 mg
R Wert: 0,77	0,54	0,34
Aldosewert: 31,0 %	32,2 %	22,5 %
Drehung: +20,9 °	+27,4 °	+8,8 °

Neokestose, Kestose und Bifurkose

Die Fraktionen I und II sind aufgrund des Aldosewertes nach Auerbach-Bodländer (Versuch 8) Trisaccharide, III ist danach ein Tetrasaccharid. Die Analysenergebnisse deuteten auf drei bereits bekannte Oligosaccharide: die Neokestose, die Kestose und das von H.H. Schlubach und H.O.A. Koehn (16) aus Roggen isolierte Tetrasaccharid, die Bifurkose (6). Es seien die gefundenen Analysenergebnisse mit denen der bekannten Zucker verglichen:

Neokestose



Berechnet

Drehung: + 21,6 °
R -Wert: 0,76 - 0,77
Aldosewert: 33,3 %

Gefunden

+ 20,9 °
0,76 - 0,78
31,0 %

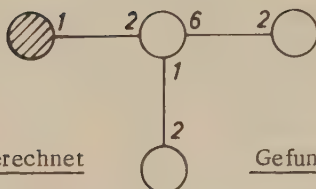
Kestose



Drehung: + 27,0 °
R -Wert: 0,54
Aldosewert: 33,3 %

+ 27,4 °
0,54 - 0,56
32,2 %

Bifurkose



<u>Berechnet</u>	<u>Gefunden</u>
Drehung: + 8,0 °	+ 8,8 °
R - Wert: 0,36	0,33 - 0,36
^s Aldosewert: 25,0 %	22,5 %

Die Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Werten bestätigt die Annahme, daß es sich bei den drei isolierten Oligosacchariden tatsächlich um die Neokestose, die Kestose und um die Bifurkose handelt. Wegen der geringen Mengen wurden keine Methylierungsanalysen ausgeführt (Versuch 10, 11, 12).

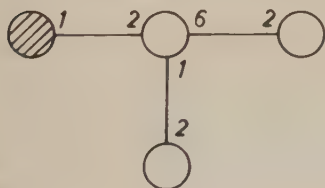
Die Neokestose wurde von D. Gross, D.J. Bell und P. H. Blanchard (32) entdeckt. Erstmals in Naturprodukten wurde die Neokestose von J.S.D. Bacon (33) in den wasserlöslichen Kohlenhydraten der Zwiebel aufgefunden. Bis dahin war sie lediglich aus Invertase-Reaktionsmischungen bekannt. Sie wurde auch von H.H. Schlubach und F. Lederer (15) im Weizen nachgewiesen, jedoch kommt sie dort in viel geringerem Maße nur vor. H.H. Schlubach und H. Lübbers (34) fanden bei der Konstitutionsaufklärung eines Polyfruktosans mit $P = 19$ aus *Lolium multiflorum*, einer Grasart, eine Dimethylfraktion mit 39 % Aldosegehalt und einer Drehung von $-7,5^\circ$, Werte, die nur durch das Auftreten einer aus Neokestose herührenden Dimethylglukose zu erklären sind. Es ist also recht wahrscheinlich, daß auch in diesem Polysaccharid eines Grases die Neokestose als Bauelement dient.

Bei der Transfruktosidierung auf Kestose (35, 36) entstehen Fruktosane nach dem Phleintyp, mit einer endständigen Glukose, wie sie im Roggen, im Weizen, aber auch in den Gräsern nachgewiesen wurden (5, 15, 16). Die Verlängerung der Kette erfolgt dort auf der Fruktosehälfte der Saccharose an der 6-Hydroxylgruppe. Dabei entsteht als einfachstes Trisaccharid die Kestose. Bei der gleichzeitigen Anlagerung eines Fruktosylrestes an der 6. und 1. Hydroxylgruppe der Fruktosehälfte der Saccharose entsteht das erwähnte

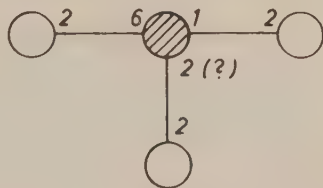
Tetrasaccharid, die Bifurkose, die aufgrund ihres Baues als Ausgangsglied zweier Reihen fungieren kann, der des Phleintyps mit der 2-6-Bindung und der des Inulintyps mit der 1 - 2 - Bindung. Im Roggen konnten beide Reihen nebeneinander nachgewiesen werden, mit der Bifurkose als Anfangsglied für beide Reihen. Das Auffinden der Bifurkose im Hafer deutet darauf hin, daß auch hier die Möglichkeit der Bildung zweier polymerhomologer Reihen vorhanden ist, von denen jedoch nur die Phleinreihe in Erscheinung getreten ist.

Die Bedeutung der Neokestose. Die Neobifurkose

Mit dem Nachweis der Neokestose war ein weiteres Aufbauprinzip in den Fruktosanen des Hafers nachgewiesen. Die Kettenverlängerung erfolgt hier auf der Glukosemolekel der Saccharose, wobei als einfachstes Trisaccharid zunächst die Neokestose entsteht. Nun kann aber erneut eine Transfruktosidierung an der Glukosemolekel der Neokestose eintreten und zu einem verzweigten Tetrasaccharid führen, in dem die Verzweigung an der Glukose einsetzt. Ein solches Tetrasaccharid wäre ein Analogon der Bifurkose:



Bifurkose



verzweigtes Tetrasaccharid

Es bietet mit der mittelständigen Glukose die Möglichkeit zur Bildung einer Reihe von glukosehaltigen Fruktosanen, bei denen die Glukose nicht wie bei den Homologen der Kestose Endglied der Kette ist.

Da die Neokestose ein Analogon der Kestose ist, kann das verzweigte Tetrasaccharid als ein Analogon der Bifurkose sinngemäß als "Neobifurkose" bezeichnet werden. Die Existenz dieser Neobifurkose konnte im jungen Hafer wahrscheinlich gemacht werden. Das Papierchromatogramm der Fruktosane des jungen Hafers enthielt nämlich nach Anfärben mit Harnstoffreagens einen stark gefärbten Fleck bei R_f 0,6 - 0,7, der keinem der gefundenen Oligo-

saccharide Neokestose, Kestose oder Bifurkose zuzuordnen ist. Ein Fruktose-freies Oligosaccharid kam ebenfalls nicht infrage, da sich der Fleck auch beim Anfärben mit Anilinphthalat zeigte. Um diese Substanz zu isolieren, wurde eine 5 %ige Lösung der Fraktion 5 auf Papierbögen im System I getrennt und nach Anfärben der abgeschnittenen Randstreifen die stark gefärbte Bande angezeichnet und nach dem Zerschneiden der Bögen eluiert. Es wurden 145 mg eines Zuckers erhalten, dessen analytische Daten folgende waren (Versuch 13):

Drehung: $+ 14,4^{\circ}$
 R_s -Wert: 0,54
 Aldosewert: 26,0 %

Zur Konstitutionsermittlung wurden 102 mg des Zuckers nach dem Verfahren von R. Kuhn, H. Trischmann und J. Löw (37) methyliert, die erhaltenen Methylverbindungen mit alkoholischer Oxalsäure gespalten und die Spaltprodukte an einer Silicagelsäule nach H.H. Schlubach und A. Heesch (38) getrennt.

Das Ergebnis war folgendes:

Tetramethyl-	:	Dimethylfraktion
36,0 mg		10,4 mg
3,05		1

Beim Eluieren mit Chloroform-Butanol (19:1) trat keine Trimethylfraktion auf.

Eine Gegenüberstellung von berechneten und gefundenen Werten:

	<u>Berechnet</u>	<u>Gefunden</u>
Tetramethyl:		36,0 mg
Drehung : $+ 31,3^{\circ}$		$+ 26,8$
Dimethyl :		10,4 mg
Drehung : $+ 64^{\circ} \rightarrow + 94^{\circ}$		$+ 85^{\circ}$
3 : 1		3,05 : 1

zeigt, daß es sich um ein verzweigtes Tetrasaccharid mit einer mittelständigen Glukose handeln muß. 3,4-Dimethylfruktose dreht negativ (Versuch 13).

Die Auffindung der drei Oligosaccharide Neokestose, Kestose und Bifurkose ließ im Hafer ein recht kompliziertes Gemisch von Fruktosanen erwarten, da sie drei Möglichkeiten des Aufbaus und der Kettenverlängerung erwarten ließen:

1. Aufbau auf der Fruktosehälfte der Saccharose, beginnend mit dem einfachsten Trisaccharid, der Kestose und weiterer Aufbau von Polyfruktosanen mit endständiger Glukose. Bei Verzweigung Bildung der Bifurkose.
2. Aufbau einer Difruktose und Bildung von glukosefreien Fruktosanen.
3. Aufbau auf der Glukosemolekel der Saccharose, beginnend mit dem einfachsten Trisaccharid der Neokestose und weiterer Aufbau von Polyfruktosanen mit Glukose in der Kette. Bei Verzweigung Bildung der Neobifurkose.

Bemerkenswert ist dabei, daß die Natur sich die Saccharose in doppelter Weise zum Aufbau von höheren Polysacchariden bedient; vermutlich, weil die Saccharose für Transfruktosidierungen energetisch eine besonders günstig gebaute Molekel darstellt.

Da von H.H. Schlubach und Mitarbeitern gezeigt wurde, daß mit zunehmender Reife der Getreidehalme von Roggen und Weizen ein Ansteigen des Gehaltes an höher polymeren Fruktosanen erfolgt, wurde für die Untersuchung der höheren Polyfruktosane des Hafers ein Material aus einem zu einer späteren Zeit geschnittenen Hafer verwendet.

DIE FRUKTOSANE AUS ÄLTEREM HAFER

Das Ausgangsmaterial

Von einer früheren Aufarbeitung, einem am 21. Juni 1949, also 12 Tage später geschnittenen Haferhalm, war ein enteweißter Alkoholextrakt vorhanden, aus dem die niederen Fruktosane bereits abgetrennt waren. Aus 146 kg frischen Haferhalmen waren 1400 g Rohkohlenhydrate erhalten worden, mit einem Aschegehalt von 9,3 % und einer Drehung von -16° .

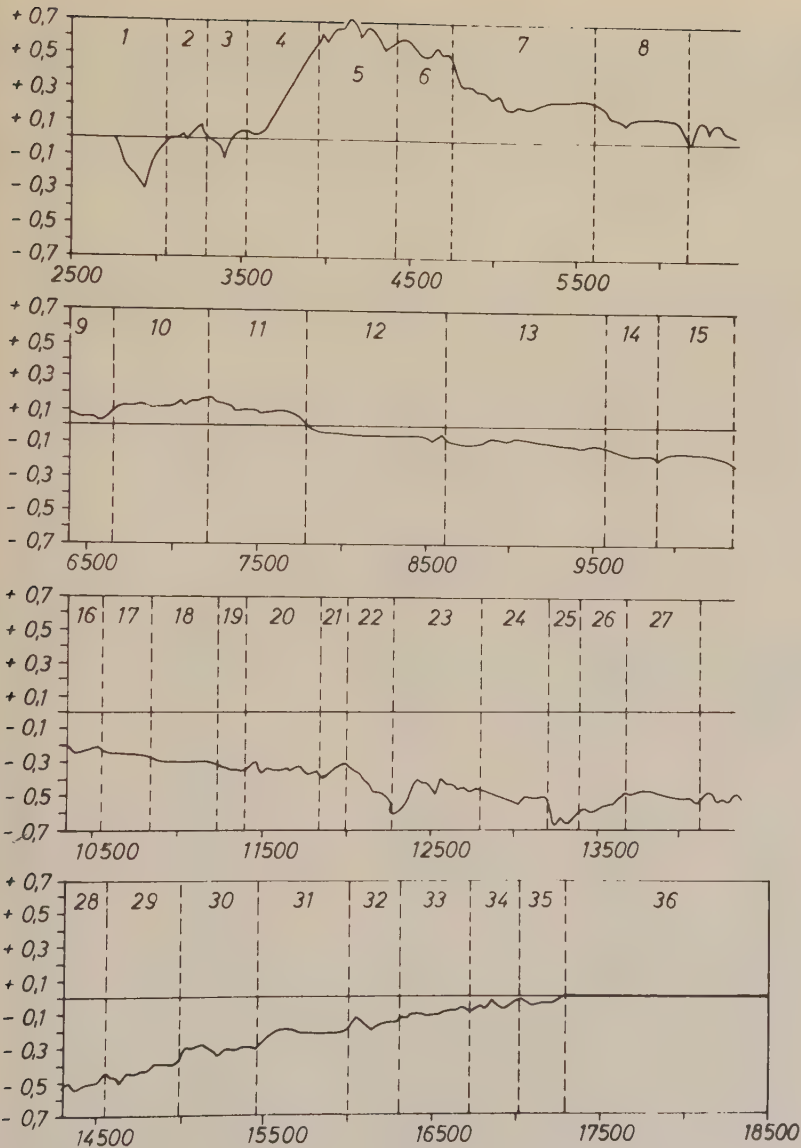
Mono- und Disaccharide

Zur Entfernung der Mono- und Disaccharide wurden 350 g Rohkohlenhydrate in Wasser gelöst und auf einer Kohle-Celite-Säule aufgebracht. Bis zur negativen Molisch-Reaktion wurde mit Wasser der Hauptteil der Mono- und Disaccharide ausgewaschen. Der Trockenrückstand des Eluates betrug 239 g = 68,5 %, er enthält auch die anorganischen Salze. Die Drehung betrug $-18,7^{\circ}$, ein Zeichen für einen hohen Gehalt an Fruktose. Das Chromatogramm zeigte Saccharose, Fruktose und wenig Glukose (Versuch 1,4).

Der Säuleninhalt wurde ausgestoßen und mit 40 - 60 %igem Alkohol extrahiert. 75,5 g = 21,6 % glasartig erstarrte Polysaccharide wurden auf diese Weise erhalten. Die Drehung betrug -21° , verglichen mit $-8,5^{\circ}$ beim jungen Hafer, und deutete auf einen verhältnismäßig hohen Anteil an langkettigen Fruktosanen. Das Chromatogramm zeigte neben Spuren Saccharose einen langen Fleck von der Startlinie bis zur Saccharose. Daraus war auf eine Mischung der niedermolekularen bis zu hochpolymerisierten Fruktosanen zu schließen.

Trennung der höheren Fruktosane mit der Kohle-Celite-Säule

70 g der Polyfruktosane wurden, wie bei der Trennung der Fruktosane beim jungen Hafer beschrieben, an einer Kohle-Celite-Säule mit kontinuierlich steigender Alkoholkonzentration fraktioniert (Versuch 5,7). Von jeder Fraktion wurde wiederum die Drehung polarimetrisch bestimmt und gegen die Menge des Eluierungsmittels aufgetragen. 18,9 l ergaben 420 Fraktionen, deren polarimetrische Messung folgende Kurve ergab:



Verlauf der Trennung der Fruktosane im älteren Hafer
mit steigender Alkoholkonzentration

Ordinate: Drehung α .

Abszisse: Menge des ausgelaufenen Eluates in ml.

Aus dem Kurvenverlauf ist zu erkennen, daß die Trennung der Fruktosane im älteren Hafer sehr viel besser verlaufen ist als bei dem Material aus jungem Hafer. Nach der Kurve werden einzelne Fraktionen mit etwa gleicher Drehung zusammen gegeben, um auf diese Weise zu möglichst einheitlichen Substanzen zu kommen. Die 36 erhaltenen Hauptfraktionen wurden nach dem Eindampfen gewogen und die spezifische Drehung jeder Fraktion bestimmt.

Um einen ersten Überblick über die Kettenlänge der einzelnen Fruktosane zu bekommen, wurde von jeder der 36 Fraktionen der Glukosegehalt enzymatisch nach H. H. Schlubach und K. Repenning (39) bestimmt (Versuch 9). Aus ihm läßt sich der Polymerisationsgrad berechnen, wenn man die Annahme macht, daß die Transfruktosidierung auf der Fruktosehälfte der Saccharose erfolgt, das gesamte Molekül also nur je eine Molekel Glukose enthält. Der Polymerisationsgrad P ergibt sich dann aus

$$P = \frac{100}{\text{enzymat. Glukosew. in \%}}$$

Ausgewogene Menge, spez. Drehung, enzymatischer Glukosewert und der daraus errechnete Polymerisationsgrad P der 36 Hauptfraktionen sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

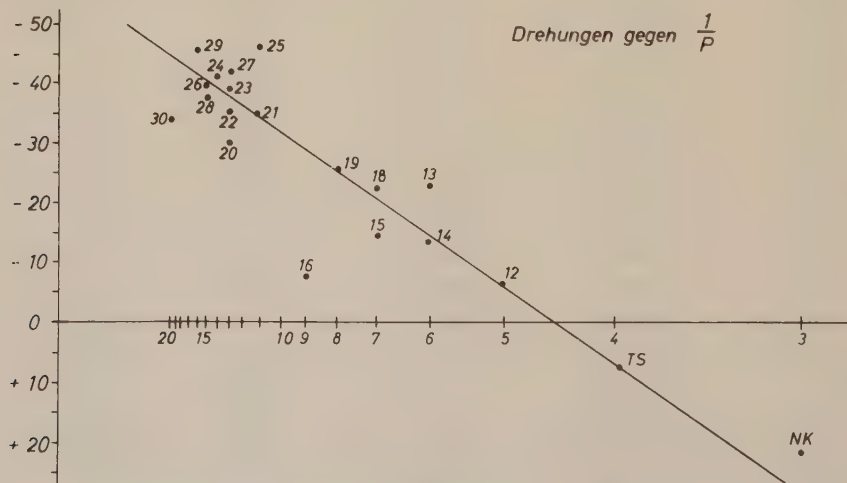
Fraktion	Menge	Drehung	Glukose- wert	Polymer. Grad
1	0,6375			
2	0,2792			
3	0,2450	0		
4	0,3986	+28,1		
5	2,0564	+49,9		
6	1,7739	+45,1	44,6	2,2
7	2,0024	+36,9	28,6	3,5
8	0,7150	+24,8	21,1	4,7
9	0,4499	+24,4	21,7	4,6
10	0,9248	+15,1	23,0	4,3
11	1,4062	+ 3,6	20,5	4,9
12	2,0093	- 6,2	17,7	5,6
13	2,0748	-22,8	15,0	6,7
14	1,2095	-13,2	14,2	7,0
15	1,6241	-14,6	12,3	8,1
16	0,7263	- 7,4	10,9	9,1
17	1,2694	-11,9	16,9	5,9
18	0,8659	-22,8	11,1	9,0
19	0,5000	-25,6	10,7	9,3
20	3,5225	-30,1	8,5	11,7
21	1,4287	-35,0	7,5	13,4
22	2,0255	-35,3	7,3	13,7
23	3,5360	-38,6	7,2	13,9
24	3,4874	-41,0	6,4	15,6
25	1,7100	-46,7	7,4	13,5
26	2,3135	-39,4	6,4	15,6
27	3,6365	-42,3	6,0	16,7
28	3,1923	-37,6	6,1	16,4
29	2,3541	-45,5	4,0	25,0
30	2,4005	-33,6	4,4	22,8
31	1,2003	-39,1	5,4	18,5
32	0,8991	-34,4	5,4	18,5
33	0,6912	-34,9	4,8	20,8
34	0,2735	-43,2	3,8	26,3
35	0,1161	-55,0	3,3	30,3
36	0,4285	-45,1	2,5	40,0

54,53 g = 77,8 % der auf der Säule gegebenen Fruktosane wurden zurückgewonnen.

Die 36 Fraktionen

Aus den in der Tabelle 1 angeführten Ergebnissen lassen sich bereits gewisse Schlüsse ziehen. Die Fraktionen 1 - 6 enthalten nur Fruktose und Saccharose. Von Fraktion 7 - 11 treten positive Drehungen auf, die auf einen niederen Polymerisationsgrad dieser Fruktosane schließen lassen. Sie machen mengenmäßig aber nur einen kleinen Teil der Gesamtmenge aus. Wie aus früheren Arbeiten bekannt ist (5), werden im Gras und im Getreide im Laufe einer Vegetationsperiode die höheren Fruktosane auf Kosten der niederen aufgebaut. Hierauf weisen auch das mengenmäßige Überwiegen der Fraktionen 12 - 30 und der Anstieg der negativen Drehung hin.

H.H. Schlubach und H.O.A. Koehn (16) haben die Drehungen der Hauptfraktionen gegen den reziproken Polymerisationsgrad aufgetragen und erhielten so zwei Gerade, die Ausdruck zweier polymerhomologer Reihen waren, der des Phlein- und der des Inulintyps. Trägt man die in der Tabelle angegebenen Werte in derselben Weise auf, so liegen zwar einige Fraktionen auf diesen Geraden, die Übereinstimmung dürfte aber mehr zufällig sein.



Drehungen der Fraktionen 12 - 30 gegen $\frac{1}{P}$, zum Vergleich die Phleingerade von Koehn (16)

Durch das Auftreten der Neokestose sind diese Abweichungen von der für den gleichen Bindungstyp charakteristischen Geraden verständlich. Im Roggen liegen nur Phlein- und Inulinbindung vor, und die so gebildeten zwei polymerhomologen Reihen mit verschiedener Bindungsart unterscheiden sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften anscheinend genügend, um getrennt werden zu können. Der Einbau von Glukose hingegen in die Kette scheint einem Fruktosan keine derartigen Eigenschaften zu verleihen, daß die Trennung von einer anderen, z.B. glukosefreien Reihe erleichtert wird. Durch das Auftreten von Glukose wird auch kein neuer Bindungstyp nötig, und dieser ist es, der ein wesentliches Kriterium zur Möglichkeit einer Trennung zu sein scheint.

Die Methylierung der Fraktionen 12 - 30

Um den Aufbau der in den einzelnen Fraktionen angefallenen Fruktosane zu klären, wurden die Fraktionen 12 - 30 nach dem Verfahren von R. Kuhn, H. Trischmann und J. Löw (37) in Dimethylformamid mit Methyljodid und Silberoxyd permethyliert (Versuch 14). Der erhaltene Methylzucker wurde anschließend mit alkoholischer Oxalsäure nach W.N. Haworth und A. Learner (40) und darauf zur Nachspaltung glykosidischer Bindungen mit 0,25 %iger Salzsäure gespalten (Versuch 15). Nach Entfernung der Säure wurden die erhaltenen Spaltprodukte in Chloroform aufgenommen und an einer Silicagelsäule nach H.H. Schlubach und A. Heesch (38) getrennt (Versuch 16). Man erhält beim Eluieren mit Chloroform die Tetramethyl-, mit Chloroform : Butanol (19 : 1) die Trimethyl- und mit Methanol die Dimethylfraktionen.

Folgerungen aus dem Ergebnis der Methylierung

Nach dem Eindampfen und Trocknen der Eluate aus der Silicagelsäule wurde jede Fraktion gewogen. Aus dem Verhältnis der Tetra : Tri : Dimethylfraktion erhält man nach Umrechnen auf Fruktose den Polymerisationsgrad, wenn man den Wert der Dimethylfraktion als Einheit nimmt. Man kommt so zu ganzen Zahlen, deren Addition direkt dem Polymerisationsgrad entspricht. Die Ergebnisse der Methylierung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Frakt.	Dreh.	Glucose- sew.	aus Gl.w. gefund.	P aus P ge- funden	Verhältnis Tetra : Tri : Di Drehung u. Aldosewert			Frakt.	Dreh.	Glucose- sew.	P aus Gl.w. gefund.	P ge- funden	Verhältnis Tetra : Tri : Di Drehung u. Aldosewert					
12	-6,2	17,7	5,6	20	5	2 : 2 : 1	+30,4 6,5%	-46,0 +40,5 29,8%	23	-38,6	7,2	13,9	7,7	13	3 : 9 : 1	+27,9 5,8%	-49,0 1,7%	+2,9 —
13	-22,8	15,0	6,7	16,7	6	2 : 3 : 1	+28,3 10,1%	-38,4 5,6%	24	-41,0	6,4	15,6	7,1	14	3 : 9 : 2	+27,3 10,0%	-48,1 1,8%	+18,8 —
14	-13,2	14,2	7,0	16,7	6	3 : 2 : 1	+15,4 10,3%	-38,4 12,9%	25	-46,5	7,4	13,5	9,1	11	3 : 6 : 2	+33,8 21,2%	-48,8 —	-53,0 —
15	-14,6	12,3	8,1	14,3	7	2 : 4 : 1	+20,0 12,9%	-44,5 7,1%	26	-39,4	6,4	15,7	6,6	15	3 : 10 : 2	+26,9 8,5%	-47,3 2%	-44,2 —
16	-7,4	10,9	9,1	11,1	9	3 : 5 : 1	+19,5 9,9%	-41,2 7,2%	27	-42,3	6,6	16,7	7,6	13	3 : 9 : 1	+19,8 4,6%	-48,3 —	-40,8 —
18	-22,8	11,1	9,0	14,3	7	2 : 4 : 1	—	—	28	-37,6	6,1	16,4	6,7	15	3 : 11 : 1	+21,5 3,7%	-49,9 2,3%	-46,2 —
19 b)	-25,6	10,7	9,3	12,5	8	2 : 5 : 1	+25,6 10,1%	-48,4 1,7%	29	-45,5	4,0	25,0	6,25	16	3 : 12 : 1	+20 11,0%	-51,5 —	-39,9 —
20	-30,1	8,5	11,8	7,7	13	3 : 9 : 1	+26,0 8,1%	-47,7 —	30	-33,6	4,4	22,8	5	20	4 : 14 : 2	+4 5,3%	-46 —	—
21	-35,0	7,5	13,4	9,1	11	2 : 8 : 1	+15,6 11,5%	-46,5 —	17 b)	-32,0	—	—	8	8	2 : 5 : 1	+16,7 11,5%	-47,3 4,3%	+4,4 49,1%
22	-35,3	7,3	13,7	7,7	13	2 : 9 : 1	+14,3 11,0%	-48,5 —										

a) in Chloroform gemessen.

b) Vergleiche mit Fraktion 17 bezw. 19.

Von jeder der Methylfraktionen wurde die spezifische Drehung bestimmt, außerdem von den meisten Fraktionen, soweit die Mengen ausreichten, der Aldosegehalt nach Auerbach-Bodländer (42). Diese Werte sind ebenfalls in der Tabelle 2 angeführt.

Entscheidend für die Zugehörigkeit zum Phleintyp oder zum Inulintyp ist die Drehung der Trimethylfraktion eines Polyfruktosans. Die 1,3,4-Trimethylfruktose dreht $-51,8^{\circ}$ (41) und kann nur bei 2-6-Bindung, die dem Phleintyp entspricht, gebildet werden. Die 3,4-6-Trimethylfruktose mit einer Drehung von $+27,7^{\circ}$ (41) nur dann, wenn eine 1-2-Bindung des Inulintyps vorliegt.

Aus der Tabelle 2 geht hervor, daß sämtliche Trimethylfraktionen negativ drehen, alle im Hafer vorkommenden Fruktosane sind nach dem Phleintyp gebaut. Die Verhältnisse der Tetra : Tri : Dimethylfraktion weisen auf eine sehr geringe Verzweigung hin, die in den meisten Fällen einmal, höchstens zweimal erfolgt ist. Anzunehmen ist die Verzweigung am Anfang der Kette, da unter den Oligosacchariden des jungen Hafers die Bifurkose, das Tetrasaccharid mit einer Verzweigung, gefunden wurde.

H.H. Schlubach und H.O.A. Koehn (16) sahen dieses Tetrasaccharid als Ausgangspunkt beider Reihen an, so daß die Verzweigung schon am Fruktosemolekel der Saccharose beginnen muß. Auch G.O. Aspinall und P.C. Das Gupta (43) isolierten aus Agaven ein verzweigtes Polyfruktosan, das die Verzweigung am Fruktosemolekül des Ruhrzuckers besitzt.

Bei der einfach verzweigten Kette errechnet sich ein Verhältnis von 3 : x : 1. Es treten jedoch im Hafer Fruktosane auf, die diesem Idealzustand nicht entsprechen, bei denen offenbar auch andere Bauprinzipien verwandt werden, wie dies auch von den Gräsern her bekannt ist. Dort täuscht das Auftreten von Dimethylfraktionen eine Verzweigung vor, obgleich diese Fruktosane unverzweigt sind. Die Ursache hierfür ist ein Fruktoseanhydrid, das bei der Methylierung ebenfalls eine Dimethylfruktose liefert. Jedoch konnte dieses Anhydrid bisher nur wahrscheinlich gemacht, aber noch nicht isoliert werden. Die Abweichungen der einzelnen Fraktionen (z.B. 12, 13, 15, 19) vom Idealzustand würden durch Transfruktosidierung auf einem solchen Fruktoseanhydrid ihre Erklärung finden.

Deutlich erkennbar ist ein Ansteigen des Polymerisationsgrades von den niederen zu den höheren Fraktionsnummern, von $P = 5$ bis $P = 20$, wobei ein gewisses Alternieren festzustellen ist. Vermutlich rührt dies daher, daß die Trennungsmethode mit kontinuierlich steigender Alkoholkonzentration bei so vielfältigen Polysaccharidgemischen, wie sie im Hafer vorliegen, nicht ausreicht, so daß es zu einem "Übereinanderschieben" von Fruktosanen mit verschiedenen Kettenlängen sowie von glukoseärmeren und glukosereicheren kommt. Sicher ist das Alternieren beim Hafer nicht ein so eindeutiger Ausdruck zweier polymerhomologer Reihen, wie es von H. H. Schlubach und H. O. A. Koehn (16) im Roggen gezeigt werden konnte.

Die Tetramethylfraktion

Eine Schwierigkeit bereitet die Klärung der Tetramethylfraktion. Bei der Annahme der Transfruktosidierung auf die Fruktosehälfte der Saccharose ist bei einem Bauprinzip von $3 : x : 1$ ein Aldosegehalt von 33 % zu erwarten, da ja eines der drei gebildeten Endglieder als Tetramethylglukose auftreten muß. Die 2, 3, 4, 6-Tetramethylglukose hat eine Drehung von $+83,3^\circ$ und gibt einen vollen Aldosewert, während die 1, 3, 4, 6-Tetramethylfruktose eine Drehung von $+31,3^\circ$ (41) aufweist und keinen Aldosewert zeigt. Man hat also bei einem Aldosewert von 5 - 20 %, wie sie bei den Tetramethylfraktionen auftreten, Drehungen wesentlich über 30° zu erwarten. Falls nur auf Fruktose aufgebaut wird, darf kein Aldosewert auftreten. Jedoch zeigen sämtliche Tetramethyl-Fraktionen der Fraktionen 12 - 30 Aldosewerte von durchschnittlich 11 % und eine Drehung unter $+30^\circ$. Diese Diskrepanz ließe sich so deuten, daß das Ende der Kette teilweise von einer andern Aldose als Glukose gebildet wird, deren Tetramethylverbindung eine sehr niedrige Drehung aufweist. Diese Forderung erfüllt die 2, 3, 4, 6-Tetramethylmannose mit einer Drehung von $+2,4^\circ$ (41). Mannose tritt als Bauelement in den verschiedensten Polysacchariden in der Natur recht verbreitet auf (45, 46, 47), wie z. B. A. Tyminsky und T. E. Timmel (44) an einem Glukomannan der Rottanne gezeigt haben.

Chromatographisch sind jedoch Tetramethylglukose, -fruktose und -mannose wegen gleicher R_f -Werte in den verschiedensten Lösungsmittelgemischen nicht zu unterscheiden (50).

Versuch zum Nachweis der Mannose

Ein völlig eindeutiger Nachweis der Mannose ist nicht gelungen. Charakteristisch für die Mannose ist ihr Phenylhydrazon, das bereits in der Kälte aus essigsaurer Lösung ausfällt und dessen Bildung durch die Gegenwart anderer Zucker nicht gestört werden soll (48, 49). Nach Hydrolyse der aus älterem Hafer isolierten Fruktosane mit n-Schwefelsäure, wurde die entsalzte Lösung mit Phenylhydrazin versetzt und nach Stehen über Nacht der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert (Versuch 18). Nach dem Trocknen zeigte das Phenylhydrazon einen Schmelzpunkt von $198 - 204^{\circ}$ und eine Drehung von -73° (Pyr.), die nach 20 Stunden auf $-15,8^{\circ}$ angestiegen war und dann konstant blieb. Ein authentisches Phenylhydrazon der Mannose zeigt jedoch eine Drehung von $+26,5^{\circ}$ (41, 49). Aus dem gewonnenen Phenylhydrazon wurde mit Benzaldehyd der Zucker in Freiheit gesetzt und so 35,4 mg eines Zuckers gewonnen mit einer Drehung von $-12,7^{\circ}$ (Versuch 19).

Authentische Mannose zeigt eine Drehung von $+14^{\circ}$ (49), jedoch konnten A. Tyminsky und T.E. Timmel (44) aus einem Glukomannan ebenfalls eine Mannose mit einer konstanten Drehung von -12° isolieren. Chromatographisch unterscheiden sich die R_f -Werte von Mannose und Fruktose in sämtlichen Lösungsmittelgemischen nur so wenig, daß auf diesem Wege keine Identifizierung möglich ist (50). Auch eine Veresterung des gewonnenen Zuckers mit Diphenylborsäure-aminoäthanol ("Flavognost") nach E. Pfeil, A. Baier und O. Balzer (51) brachte kein eindeutiges Ergebnis (Versuch 20).

Die Existenz der Mannose konnte also nicht bewiesen, jedoch wahrscheinlich gemacht werden.

Die Neokestose als Baustein höherer Fruktosane

Wegen des Auffindens der Neokestose im jungen Hafer war zu erwarten, daß die Glukose dieses Trisaccharides bei der Methylierungsanalyse der höher polymerisierten Fruktosane wieder in Erscheinung tritt. Dient sie als Ort der Verzweigung, ist die Glukose als Dimethylglukose zu erwarten, ist sie ein Glied in der Kette, als Trimethylglukose.

Die Dimethylfraktionen speziell der Fraktionen 12 - 19 weisen Aldosewerte bis zu 50 % auf und gleichzeitig positive Drehungen. Dies ist eine Folge des Auftretens der 3,4-Dimethylglukose mit einer Drehung von $+94,8^{\circ}$. Es steht damit außer Zweifel, daß die Glukose in den höher polymerisierten Fruktosanen in sehr erheblichem Maße neben der Fruktose als Ort der Verzweigung auftritt. Wenn auch der Grad der Verzweigung nur ein sehr geringer ist, so tritt gerade an dieser Verzweigungsstelle die Neokestose besonders stark auf, denn nur so ist die beträchtliche Bildung von Dimethylglukose zu erklären. Daß nicht nur an der Glukose Verzweigungen beginnen, beweist das gleichzeitige Auftreten der 3,4-Dimethylfruktose mit einer Drehung von -50° . Die Drehungen beider Dimethylhexosen addieren sich, so daß die in der Tabelle 2 angegebenen Werte zustande kommen. Beide Dimethylverbindungen konnten nebeneinander nachgewiesen werden (Versuch 21).

Das bereits früher beschriebene verzweigte Tetrasaccharid, die Neobifurkose aus jungem Hafer, ist also in einem älteren Material als Oligosaccharid verschwunden und dient nunmehr als Baustein in einer längeren Kette, wo die Verzweigungen beginnen.

Die Trimethylfraktionen der Fraktionen 12 - 16 weisen ebenfalls einen Aldosegehalt auf, herrührend von der 2,3,4-Trimethylglukose mit einer Drehung von $+66,8^{\circ}$. Die Glukose wird also ebenfalls in die Kette eingebaut. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von J.C. Irvine und T.N. Montgomery (52) sowie E.L. Hirst, D.J. McGilvray und E.G.V. Percival (53), die unter den Methylierungsprodukten des Inulins Trimethylglukose fanden und daraus auf den Einbau von Glukose innerhalb der Fruktosekette schlossen.

Das Avenarin und Aigilopsin sowie eine höhere Fraktion aus jungem Hafer

In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse einer Methylierungsanalyse der Fraktion 17 aus jungem Hafer mit angeführt. Diese Fraktion war chromatographisch frei von niederen Fruktosanen und wurde nachträglich zur Kontrolle der am älteren Material gewonnenen Erkenntnisse untersucht. Polymerisationsgrad, Drehung, Aldosegehalt der Methylfraktionen sowie deren Drehungen entsprechen ganz denen aus dem älteren Material - bei die-

sem etwa der Fraktion 19 - so daß diese Analyse als ein Beweis der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dienen mag.

Auch das von H.H. Schlubach und H. Müller (30) aus Haferhalmen isolierte Avenarin, ebenso wie das von H.H. Schlubach und P. Hauschildt (31) auf Haferähren isolierte Aigilopsin fügen sich in die Reihe der untersuchten Polyfruktosane ein. Beide sind nach dem Phleintyp gebaut, weisen eine einfache Verzweigung auf und die Drehungen der Tetra-, Tri- und Dimethylfraktionen entsprechen den in der Tabelle angegebenen Werten. Möglicherweise ist bei der Art der Darstellung - Fraktionierte Fällung - ein glukosefreies Fruktosan ausgefällt worden, da die Invertin-spaltung nur Fruktose ergab und die Methylfraktionen keinen Aldosegehalt aufweisen. Es handelt sich aber bei beiden Fruktosanen um ein aus der Gesamtzahl isoliertes Einzelglied.

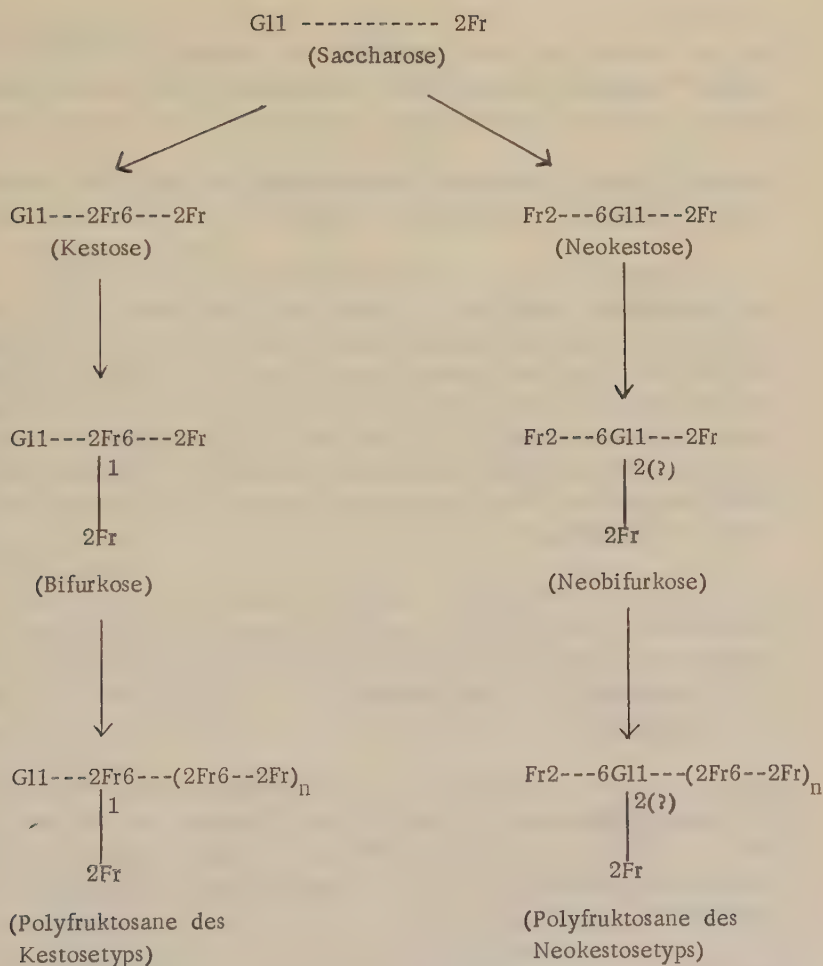
DISKUSSION

Aus den analytischen Ergebnissen der Zusammensetzung des in jungen und älteren Haferpflanzen enthaltenen Gemisches von Oligo- und Polysacchariden läßt sich folgendes Bild ihrer Biogenese gewinnen:

Die Transfruktosidierung kann auf zweierlei Weise erfolgen: entweder auf der Fruktosehälfte der Saccharose an deren sechster Hydroxylgruppe unter Bildung der Kestose, oder auf der Glukosehälfte unter Bildung der Neokestose. Aus der Kestose kann weiter unter Transfruktosidierung an ihrem mittleren Fruktoseglied unter gleichzeitiger Verzweigung die Bifurkose entstehen. Aus der Neokestose bildet sich durch Transfruktosidierung an der mittelständigen Glukose und ebenfalls Verzweigung auf dieselbe Weise die Neobifurkose. Die Bifurkose wächst durch weitere Transfruktosidierung an der sechsten Hydroxylgruppe einer Fruktosemolekel, im allgemeinen ohne Wiederholung der Verzweigung, zu einem Polysaccharid der Phleinreihe, mit maximal 20 Fruktosegliedern. Die Glukose bleibt endständig.

Konkurrierend werden aus der Neobifurkose durch Transfruktosidierung auf einer ihrer Fruktoseglieder Polysaccharide gebildet, in denen die Glukose an die zweite Stelle in der Kette gerückt ist und den Ort der Verzweigung darstellt. So entstehen Gemische von Polymeren, die bei den höheren Gliedern so wenig verschieden sind, daß sie nicht mehr getrennt werden können.

Neben diesem Grundschemata erfolgt die primäre Transfruktosidierung außer auf der Saccharose selber auch auf einer gleichzeitig anwesenden Hexose, wahrscheinlich Mannose. Diese tritt in dem Schema an die Stelle der Glukose.



In ihrer Gesamtstruktur sind also die Polyfruktosane des Hafers denjenigen der Gräser analog gebaut. Sie unterscheiden sich aber von diesen durch eine geringe Verzweigung, da die Graspolyfruktosane unverzweigt sind. In dieser Hinsicht nähern sie sich den Polyfruktosanen des Roggens und Weizens, die allerdings weit stärker verzweigt sind. Mit diesen haben sie auch gemeinsam, daß die primäre Transfruktosidierung außer auf der Fruktosehälfte auch auf der Glukosehälfte der Saccharose unter Bildung

der Neokestose eintreten kann. Dabei bilden sich Polyfruktosane, in denen die Glukose nicht mehr endständig ist. Allerdings wurde auch bei einem Polysaccharid einer Grasart, dem *Lolium multiflorum* (34), gefunden, daß in ihm der Aufbau teilweise auf der Neokestose erfolgt ist.

Mit zunehmendem Polymerisationsgrad nähern sich die Polysaccharide des Hafers in ihrem Bau denjenigen der Gräser.

Auch hinsichtlich der den Aufbau bewirkenden Enzyme (54, 55, 56) ist eine weitgehende Ähnlichkeit zu denen der Gräser festzustellen. Denn in den Gräsern ist nur die Phleinase anzunehmen, wie aus der Transfruktosidierung allein auf der sechsten Hydroxylgruppe der Fruktose hervorgeht (5), während beim Roggen und Weizen, z.B. dem Graminin der Roggenähren, mit ihren Bindungen über die erste Hydroxylgruppe, die Inulase überwiegt. Das Auftreten der Bifruktose mit ihren 1-2-Bindungen beweist allerdings, daß im Hafer auch Inulase, wenn auch nur in geringer Konzentration, anzunehmen ist.

Da im Hafer im beträchtlichen Maße Fruktosane mit Neokestose als Grundbaustein gefunden wurden und eine Kettenverlängerung außer an der Fruktose auch an der Glukose erfolgt ist, tritt hier vielleicht zusätzlich eine besondere Transglukosedase zum Aufbau der Neokestose und ihrer Homologen auf.

Der Hafer nimmt morphologisch eine Zwischenstellung zwischen den Gräsern und dem Getreide ein. Auch die am Kohlenhydratstoffwechsel im Hafer beteiligten Enzyme weisen auf diese Übergangsstellung des Hafers unter den Gramineen hin und die chemische Untersuchung konnte diese bestätigen.

Der Hafer ist also als eine Grasart anzunehmen, bei der die Samenbildung zu einer solchen Größe erfolgt, daß die in diesen enthaltene Stärke ebenso wie bei den Getreidearten für die tierische und menschliche Ernährung verwertet wird, während bei den anderen Grasarten die Samen so klein bleiben, daß nicht sie, sondern die in den Achsen und Blättern gebildeten Nährstoffe der tierischen Ernährung dienen.

Zusammenfassung

Es wurden die löslichen Kohlenhydrate aus Haferhalm untersucht. Dabei konnten aus einem jungen Material die bekannten Oligosaccharide Neokestose, Kestose und Bifurkose papierchromatographisch getrennt werden. Zusätzlich wurde ein am mittelständigen Glukosemolekül verzweigtes Tetrasaccharid isoliert, für das als Analogon zur Bifurkose der Name "Neobifurkose" vorgeschlagen wird.

Diese Oligosaccharide dienen außer Fruktose zum Aufbau höherer Fruktosane. Aus einem älteren Material konnten mit einer Kohle-Celite-Säule die höheren Fruktosane getrennt werden. Von den 36 gewonnenen Fraktionen wurden achtzehn durch Methylierungsanalyse untersucht. Geringe Verzweigung, nur eine Bindungsart - Phleintyp - sowie ein Polymerisationsgrad von maximal 20 deuten auf die nahe Beziehung zu den Fruktosanen der Gräser. Abweichend von den Fruktosanen der Gräser wird Neokestose in hohem Maße eingebaut und deren Glukosemolekül dient als Ort der Verzweigung.

Glukosefreie Fruktosane, glukosehaltige mit endständiger Glukose - Homologe der Kestose - und glukosehaltige mit Glukose in der Kette - Homologe der Neokestose - bilden drei etwa in gleichem Maße vertretene polymerhomologe Reihen, deren Trennung nur in geringem Umfang möglich war.

Mannose wird als weitere Aldose zum Aufbau wahrscheinlich gemacht.

Die morphologische Zwischenstellung des Hafers zwischen den Gräsern und den Getreidearten konnte so durch einen Überblick über den Gesamtkohlenhydratstoffwechsel auch chemisch bestätigt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Versuch 1

Chromatographie: Papier Schleicher und Schüll 602 h:p
System Isopropanol : Butanon : Dimethylformamid : Wasser
(50 : 25 : 5 : 20) (=System I)
Laufzeiten 18 - 48 Stunden
Sprühreagenzien: Harnstoffreagens (Fruktose)

(2 g Harnstoff + 10 ml Wasser + 12 ml 84%-
Phosphorsäure + 40 ml Butanol + 40 ml Me-
thanol) Anfärben bei 105 - 110 ° 10 Min.

Saures Anilinphthalat (Aldosen)
(1,66 g Phthalsäure + 0,93 g Anilin + 100 ml
wassergesättigtes Butanol) 100 - 110 °
10 Min.

Bei allen Versuchen lief als Vergleichssubstanz Saccharose mit
($R_s = 1,00$)

Versuch 2

Isolierung der löslichen Kohlenhydrate aus Frischsubstanz

16 kg kleingehäckselter Hafer wurden in Portionen zu 2 kg mit 6 l 60 %igem Alkohol eine Stunde im Wasserbad gekocht und anschließend noch heiß abgepreßt. Die erhaltenen 48 l Alkoholextrakt wurden im Vak. bei 30 - 40 ° bis zum dünnen Sirup eingedampft. Die Menge des eingedampften Preßsaftes betrug 2 l. Dieser Preßsaft wurde mit einer Aufschlammung von basischem Bleiacetat in dest. Wasser solange versetzt, bis kein Eiweißniederschlag mehr ausfällt. Anschließend wurde im selben Ansatz das überschüssige Blei mit Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 ausgefällt. Durch filtrierte Reagensglasproben kann man sich leicht überzeugen, ob noch Blei in der Lösung enthalten ist.

Die ca. 8 l Flüssigkeit wurden zentrifugiert und der Bodensatz zweimal mit dest. Wasser ausgewaschen. Überstand und Waschwasser wurden vereinigt und i. V. bei möglichst tiefer Temperatur eingedampft. Der Rückstand ist ein hellbrauner Sirup.

Versuch 3

Darstellung der Fruktosane aus den Rohkohlenhydraten

Aus dem dünnen Sirup wurden mit 96 %igem Alkohol die Fruktosane ausgefällt, die als zäher Sirup anfielen. Nach Trocknen im Vak. zunächst am Wasserstrahlvak., dann über P_2O_5 blieben 247 g einer krümeligen, hygroskopischen, nur wenig gefärbten Masse.

Aschegehalt: 13,8 %, so daß 214 g netto vorlagen

Drehung : + 4,6 ° (W), c = 1,1 g

Die eingedampften Mutterlaugen gaben 230 g sehr hygroskopische, braune, krümelige Masse.

Aschegehalt 25,8 %, so daß 170 g netto vorlagen

Drehung: +8,8 ° (W)

Versuch 4

Die Kohle-Celite-Säule

500 g Kohle (Merck) und 500 g Celite 535 "Floridin") wurden in 4 l dest. Wasser innig gemischt, abgesaugt, wiederum in Wasser aufgerührt und nochmals gewaschen.

Nach dem Absaugen wurde das Kohle-Celite-Gemisch in 3 l Wasser aufgeschlämmt und in eine 150 x 8 cm Glassäule mit Hahn, die unten mit etwas Watte verstopft wird, eingefüllt. Nach dem Absitzen der Kohle über Nacht ist die Säule betriebsfertig.

Versuch 5

Trennung mit der Kohle-Celite-Säule

Zur Erreichung einer kontinuierlich steigenden Alkoholkonzentration wurden 2 Flaschen á 10 l so hintereinander geschaltet, daß in die untere nur so

viel aus der oberen nachlief, wie aus der unteren auslief. Um eine Durchmischung des Alkohols in der unteren Flasche zu erreichen, wurde diese zusätzlich mit einem Rührmotor versehen, der über eine Uhr alle Stunde für fünf Minuten Strom bekam.

1. Untere Flasche 8 l dest. Wasser
2. Obere Flasche 8 l 25 %igen Alkohol, wenn dieser verbraucht
3. Obere Flasche 8 l 33 %igen Alkohol, wenn dieser verbraucht
4. Obere Flasche 8 l 45 %igen Alkohol, dann untere Flasche auslaufen lassen. Danach sind in allen Fällen sämtliche Zucker aus der Säule eluiert.

Tropfgeschwindigkeit: 40 - 60 ml/h, wird mit steigender Alkoholkonzentration langsamer.

Fractionen mit gleicher Drehung wurden zusammengefaßt und bei 30 - 40 ° i. V. eingedampft, anschließend mit P_2O_5 an der Ölpumpe nachgetrocknet.

Dauer einer Trennung etwa 4 - 5 Wochen.

Versuch 6

Trennung der Oligosaccharide auf Papierbögen

Eine 5 %ige Lösung des Fruktosangemisches der Fraktion 5 wurde auf Papierbögen Schleicher und Schüll 602 h:p 10 cm vom oberen Rand in einem 1/2 - 1 cm breiten Streifen mit einer feinen Pipette aufgetragen und nach dem Trocknen absteigend im System I (Versuch 1) chromatographiert. Die Laufzeit betrug 40 Stunden. Zum besseren Abtropfen des Lösungsmittelgemisches wurden an der Unterseite der Bögen ca. 2 cm tiefe Zacken ausgeschnitten.

Nach dem Trocknen bei 50 ° wurden jeweils vom linken und rechten Rand sowie aus der Mitte ca. 2 cm breite Streifen abgeschnitten. Diese wurden mit Harnstoffreagens angesprüht und bei 110 ° entwickelt. Die einzelnen Zonen wurden auf den Bögen angezeichnet und Streifen mit demselben R_f -Wert ausgeschnitten und bis zur negativen Molisch-Reaktion mit dest. Wasser eluiert.

Das Eluat wurde i. V. zur Trockne eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen, filtriert und erneut eingedampft und über P_2O_5 getrocknet.

Versuch 7

Drehungen: Wenn nicht anders angegeben, wurden sämtliche Drehungen in Wasser im 1 dm-Rohr ausgeführt.

Konzentration: 0,1 g/100 ml.

Versuch 8

Bestimmung des Aldosewertes nach Auerbach-Bodländer

50 - 100 mg des Zuckers wurden mit der 1 1/2 - 2fachen Menge der zu erwartenden Aldose n/10 Jodlösung versetzt, anschließend mit Phosphatpuffer und 1 1/2 - 2 Stunden im Dunkeln stehen gelassen. Hierauf wird mit 25 %iger Schwefelsäure angesäuert und das nicht umgesetzte Jod nach Zusatz einiger Tropfen Stärkelösung mit n/10 Thiosulfatlösung zurücktitriert. 1 ml Jodlösung entspricht 9,005 mg Aldose.

Bei Aldosebestimmungen von höher polymerisierten Fruktosanen wurden diese vorher mit 1 n Schwefelsäure 48 Stunden bei Zimmertemperatur hydrolysiert, gegen Phenolphthalein mit Natronlauge neutralisiert und die Bestimmung der Aldosen wie oben ausgeführt.

Versuch 9

Glukosewerte enzymatisch

Diese Methode erlaubt das Arbeiten mit sehr geringen Substanzmengen und ist daher in manchen Fällen der Bestimmung nach Auerbach-Bodländer vorzuziehen. Die Zuckereinwaage, etwa 10 mg, wird in 5 ml Wasser aufgenommen, davon gelangen 0,2 ml in 5 ml Glukosereagens nach Boehringer zur Untersuchung. Gemessen wird die Intensität des braunen Farbstoffkomplexes gegen die Eigenfarbe des Reagenzes sowie eine mitgelieferte Standardglukose im Zeiss Elko mit Filter S 49.

Der Glukosewert ergibt sich dann nach der Formel

$$\frac{\Delta E_{\text{Probe}} \cdot 50}{\Delta E_{\text{Standard}} \cdot \text{Einwaage in mg}} = \% \text{ Glukose}$$

Es ist sehr zu empfehlen, eine bekannte Glukoseeinwaage mitzubestimmen, da die Qualität des Reagenzes wechselt.

Versuch 10

Neokestose

59,8 mg

Lösungsmittelgemisch: System I (Versuch 1)

R_s -Wert 0,76 - 0,77

Aldosewert nach Auerbach-Bodländer: nach Hydrolyse mit
1 n Schwefelsäure: 31,0 %

Drehung: $+20,9^\circ$ (W) (0,1 g/100 ml; 1 dm)

Versuch 11

Kestose

23,7 mg

System I: R_s -Wert: 0,54

Aldosewert nach Hydrolyse: 32,2 %

Drehung: $+27,4^\circ$ (W) (0,1 g/100 ml; 1 dm)

Versuch 12

Tetrasaccharid von Koehn (Bifurkose)

System: I: R_s -Wert: 0,36

Aldosewert nach Hydrolyse: 22,5 %

Drehung: $+8,8^\circ$ (W) (c = 1; 1 dm)

Versuch 13

Verzweigtes Tetrasaccharid (Neobifurkose)

System I: R_s -Wert:

Isolierung nach Versuch 6. Ausschneiden der stark gefärbten
Zone mit R_s 0,6 - 0,7.

Eluieren mit Wasser gab aus drei verschiedenen Trennungsversuchen mit
jeweils 6 Bögen:

a) 98,0 mg

R_s -Wert: 0,54

Drehung: +14,3°

Aldosewert: 23,9 %

b) 47,8 mg

R_s -Wert: 0,56

Drehung: +14,6° (W)

Aldosewert: 28,2 %

c) 102 mg

Drehung: +14,4° (W)

R_s -Wert: 0,56

Methylierung nach Kuhn, Trischmann und Löw:
(Versuch 14).

102 mg ergaben 110 mg Methylverbindung, diese wurde mit 30 ml Alkohol und 15 ml Wasser, in denen 0,5 g Oxalsäure gelöst waren, gespalten und aufgearbeitet wie in Versuch 15 beschrieben.

Die Trennung der Spaltprodukte (51,2 mg) an einer Silicagelsäule (10 g Silicagel + 6 ml Wasser) ergab: (vergl. Vers. 16) 36,0 mg Tetramethylverbindung mit einer Drehung von +26,8° (W) und 10,4 mg Dimethylverbindung mit einer Drehung von +85° (W).

Beim Eluieren mit Chloroform-Butanol (19 : 1) trat kein Trimethylzucker auf.

Ein Aldosewert konnte wegen der geringen Mengen nicht bestimmt werden.

Versuch 14

Methylierung nach Kuhn, Trischmann und Löw

0,1 - 1 g des Zuckers wurden in 10 ml Dimethylformamid unter gelindem Erwärmen gelöst und bei ca. 20° mit 6 ml Methyljodid versetzt. Unter Rühren wurden 6 g Silberoxyd zugegeben, nach 24 Std. Schütteln auf der Maschine wurden erneut 6 ml Methyljodid und 6 g Silberoxyd zugegeben und nochmals 24 Stunden geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Bodensatzes wurde dieser mit Chloroform sehr gut ausgewaschen und die Auszüge vereinigt, mit 100 ml Wasser und 2 g KCN versetzt und mehrfach mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und i. V. eingedampft. Die Methylverbindung blieb als gelber Sirup zurück. Aus 800 mg Zucker entstehen etwa 850 mg Methylverbindung.

Die Drehung wird in Chloroform bestimmt.

Versuch 15

Spaltung der Methylverbindung

650 mg des Methylzuckers wurden in 300 ml Athanol gelöst, mit 4,5 g Oxalsäure in 150 ml Wasser versetzt und 40 Stunden auf 80 - 85 ° erwärmt. Die Lösung wurde dann mit Natriumhydrogencarbonat unter Rühren neutralisiert, filtriert und i.V. bei 40 ° eingedampft. Zur Nachspaltung etwa gebildeter Fruktoside wurde der Rückstand mit 100 - 150 ml 0,25 %iger HCL 45 Min. auf 80 ° erwärmt, gekühlt, mit Natriumbikarbonat neutralisiert und i.V. eingedampft. Nach dem Trocknen wurde sorgfältig mit Chloroform extrahiert und wiederum eingedampft.

Versuch 16

Trennung der Methylspaltprodukte an der Silicagelsäule

50 g Kieselgel (Merck, fein gepulvert für Verteilungschromatographie) wurden mit 30 ml Wasser innig verrieben und 1/2 Stunde bedeckt stehen gelassen. Hierauf wurde das Pulver in Chloroform aufgeschlämmt und in eine kleine Säule gefüllt. Die Säule wurde mit 200 ml Chloroform gewaschen und dann 450 mg Spaltprodukte gelöst in Chloroform aufgegeben.

Man eluiert mit Chloroform die Tetramethylfraktion bis mit dem Molisch-Reagens kein Zucker mehr nachweisbar ist. Hierauf mit Chloroform-Butanol (19 : 1) die Trimethylfraktion und anschließend mit Methanol die Dimethylfraktion.

Die einzelnen Fraktionen wurden i.V. eingedampft und gewogen:

Tetramethylfraktion	110,4 mg
Trimethylfraktion	247,3 mg
Dimethylfraktion	<u>47,5 mg</u>
	405,2 mg = 90 %

Zur Drehung wurden die einzelnen Fraktionen in 5 oder 10 ml Wasser aufgenommen. Hierbei traten durch Spuren miteluierten Silicagels oft Trübungen auf, die eine Bestimmung der Drehung unmöglich machten. Sie können durch Zentrifugieren bei 30 000 U/Min. in 20 Min. leicht entfernt werden.

Anschließend wurde in dieser Lösung der Aldosegehalt nach Auerbach-Bodländer bestimmt.

Versuch 17

Trennungversuch mit der Grycksbo-Säule

Verwendet wurde die Grycksbo Chromatographic Filter Paper Column, Type LKB 3391. Die Säule wurde mit dem Lösungsmittelgemisch System I (Versuch 1) gründlich gewaschen und dann eine Lösung der Zucker im selben Lösungsmittelgemisch nach Vorschrift eingefüllt. Mit einem Fraktions-sammler wurde das Eluat aufgefangen und die Fraktionen durch optische Drehung geprüft.

Fraktionen mit ähnlicher Drehung wurden vereinigt, im Vak. bei 40 ° eingedampft und Reste von Dimethylformamid mit der Ölpumpe bei 0,01 mm entfernt.

Versuch 18

Versuch zum Nachweis der Mannose

30 g Monosaccharide aus jungem Hafer wurden mit 150 ml 1 n Schwefel-säure 48 Stunden hydrolysiert, anschließend mit Natronlaugel neutralisiert und mit den Ionenaustaschern Amberlite IRA 410 die Anionen, mit Amberlite IR 120 die Kationen entfernt.

Die wässrige Zuckerlösung wurde auf 50 ml eingengt und mit 2,5 ml Phenylhydrazin + 2,5 ml Eisessig versetzt. Nach 12 Stunden Stehen bei Zimmertemperatur wurde von dem ausgeschiedenen Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Wasser, anschließend mit eiskaltem Alkohol gewaschen.

Nach dem Umkristallisieren aus viel Alkohol war der Schmelzpunkt: 198 - 204 °.

Drehung: - 73 ° $\xrightarrow{24 \text{ Std.}}$ - 15,8 ° (Pyr.)

Ein aus den Polysacchariden des alten Hafers genauso dargestelltes Phenylhydrazon hatte folgende Eigenschaften:

Schmelzpunkt: 197 - 202 °.

Drehung: - 84 ° $\xrightarrow{24 \text{ Std.}}$ - 13,4 ° (Pyr.)

Versuch 19

Freisetzung des Zuckers aus dem Phenylhydrazon

Das Phenylhydrazon (50 mg) wurde in alkoholischer Lösung mit 2 ml Benzaldehyd 8 Stunden gerührt, i.V. eingedampft, mit Wasser aufgenommen und sechsmal mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Schicht wurde i.V. eingedampft, es blieb eine geringe Menge eines sirupösen Rückstandes.

Menge: 35,4 mg

Drehung: $-12,7^{\circ}$ (W) (nach 60 Std. unverändert)

Chromatographische Untersuchung des so gewonnenen Zuckers:

Butanol : Eisessig : Wasser (4:1:1) keine Unterscheidung von Fruktose möglich

System I : keine Unterscheidung von Fruktose möglich

Butanol : Äthanol : Wasser (5:1:4) derselbe R_f - Wert wie Fruktose.

Versuch 20

Trennungsversuch von Mannose und Fruktose mit "Flavognost"

Die Zuckerlösung wurde mit Flavognost (Diphenylborsäureaminoäthanol), 100 mg / 100 ml versetzt und im Lösungsmittelgemisch Butanol : Essigsäure : Wasser (4:1:5) chromatographiert. Laufzeit 15 Stunden.

Ergebnis: keine eindeutige Unterscheidung von Fruktose und Mannose, da die Flecken nicht genügend auseinander gezogen sind.

Versuch 21

3,4-Dimethylfruktose und 3,4-Dimethylglukose

Lösungsmittelgemisch: Butanol : Essigsäure : Wasser (4:1:5) aufsteigend 18 Stunden.

Entwicklung mit Anilinphthalat und Harnstoffreagens.

Ergebnis: zwei Flecken, R_f 0,52 (3,4-Dimethyl-Glukose)

R_f 0,62 (3,4-Dimethyl-Fruktose)

LITERATURVERZEICHNIS

1. Freudenberg, K., Z. Ang. Chem. 69, 419 (1957)
2. Heyns, K., Die neueren Ergebnisse der Stärkelforschung,
Braunschweig 1949
3. Haworth, W.N., Boichem. J. 31, 786 (1937)
4. Montgomery, R. u. J. Amer. Chem. Soc. 79, 446 (1957)
Smith, F.,
5. Schlubach, H.H., Der Kohlenhydratstoffwechsel der Gräser,
Fortschritte der Chemie organischer Natur-
stoffe XV (Wien 1958)
6. Schlubach, H.H., ebenda XIX, im Druck
7. Schlubach, H.H., A. 594, 33 (1955)
Gassmann, L.,
8. Schlubach, H.H. u. A. 587, 111 (1954)
Holzer, K.
9. Schlubach, H.H. u. A. 544, 101 (1940)
Ketu Sinh, O.
10. Schlubach, H.H. u. A. 544, 111 (1940)
Ketu Sinh, O.,
11. Schlubach, H.H. u. A. 606, 130 (1957)
Koehn, H.O.A. ,
12. Schlubach, H.H. u. A. 594, 41 (1955)
Lübbers, H.,
13. Schlubach, H.H. u. A. 497, 208 (1932)
Knoop, H.,

14. Schlubach, H.H. u. A. 520, 43 (1935)
Schmidt, H.,
15. Schlubach, H.H. u. A. 635, 154 (1960)
Lederer, F.,
16. Schlubach, H.H. u. A. 614, 126 (1958)
Koehn, H.O.A.,
17. Schlubach, H.H. u. A. 614, 119 (1958)
Haberland, E.,
18. Schlubach, H.H. u. A. 614, 123 (1958)
Haberland, E.,
19. Schlubach, H.H. u. A. 561, 180 (1949)
Rathje, E.,
20. Whistler, R.L. u. J. Amer. Chem. Soc. 72, 677 (1950)
Durso, D.F.
21. Müntz, A., C. r. 87, 697 (1878)
22. Tanret, Ch., C. r. 112, 293 (1891)
23. Schulze, E. u. Zeitschr. physiol. Chem. 20, 519 (1895)
Frankfurt, S.,
24. de Rawton, O., C. r. 125, 797 (1897)
25. Schulze, E., Zeitschr. physiol. Chem. 27, 282 (1899)
26. Schulze, E., Zeitschr. physiol. Chem. 20, 537 (1895)
27. Colin H. u. C. r. 177, 973 (1923)
Belval, H.,
28. Belval, H., Rev. gen. Bot. 36, 308 (1924)

29. Morris, D.L., J. Biol. Chem. 142, 881 (1941)
30. Schlubach, H.H. u. A. 572, 106 (1951)
Müller, H.,
31. Schlubach, H.H. u. A. 578, 201 (1952)
Hausschildt, P.,
32. Gross, D., J. Chem. Soc. 1954, 1727
Blanchard, P.H. u.
Bell, D.J.,
33. Bacon, J.S.D., Biochem. J. 67, 1 5P (1957)
34. Schlubach, H.H. u. A. 598, 225 (1956)
Lübbers, H.,
35. Schlubach, H.H., A. 595, 229 (1955)
Lübbers, H. u.
Borowsky, H.,
36. Albon, N., J. Chem. Soc. 1953, 24
Bell, D.J.,
Blanchard, P.H.,
Gross, D. u.
Rundell, J.T.,
37. Kuhn, R., Z. Ang. Chem. 67, 32 (1955)
Trischmann, H. u.
Löw, J.,
38. Schlubach, H.H. u. A. 572, 114 (1951)
Heesch, A.,
39. Schlubach, H.H. u. Z. Ang. Chem. 71, 193 (1959)
Repenning, K.,
40. Haworth, W.N. u. J. Chem. Soc. 130, 619 (1928)
Learner, A.,

41. Micheel, F., Chemie der Zucker und Polysaccharide,
II. Aufl., Leipzig 1956
42. Auerbach, F. u. Z. Ang. Chem. 36, 602 (1923)
Bodländer, E.,
43. Aspinall, G.O. u. J. Chem. Soc. 1959, 718
Das Gupta, P.C.,
44. Tyminsky, A. u. J. Amer. Chem. Soc. 82, 2823 (1960)
Timmel, T.E.,
45. Smith, F. u. J. Amer. Chem. Soc. 81, 1715 (1959)
Srivastara, H.S.,
46. Henderson, M.E., J. Chem. Soc. 1958, 3519
Hough, L. u.
Paniter, T.J.,
47. Prentice, N., J. Amer. Chem. Soc. 81, 684 (1959)
Cendel, A. u.
Smith, F.,
48. Handbuch der Pflanzen- Bd. II, S. 829 (Wien 1932)
analyse
49. Tollens-Elsner, Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate
S. 298 Leipzig 1935
50. Advances in Carbohydrate Chemistry Vol. IX, S. 346 u. S. 352
51. Pfeil, E., Baier, A. Z. Ang. Chem. 70, 702 (1958)
u. Balzer, O.,
52. Irvine, J.C. u. J. Amer. Chem. Soc. 55, 1988 (1933)
Montgomery, T.N.,
53. Hirst, E.L., J. Chem. Soc. 1950, 1297
McGilvray, D.J. u.
Percival, E.G.V.,

54. Schlubach, H.H., A. 627, 123 (1959)
 Hohn, G. u.
 Repenning, K.,
55. Schlubach, H.H., Z. Ang. Chem. im Druck
56. Schlubach, H.H. A. im Druck

LEBENS LAUF

Am 29. Dezember 1931 wurde ich als Sohn des Versicherungskaufmannes Dr. Werner Berndt und seiner Ehefrau Gertrud, geborene Reimpell, in Lübeck geboren. Nachdem ich die Volksschule in Hamburg-Nienstedten absolviert hatte, besuchte ich den humanistischen Zweig des Christianeums in Hamburg-Othmarschen, wo ich 1952 das Abitur bestand.

Im Sommer 1952 begann ich mit dem Chemiestudium in Basel, ging nach zwei Semestern nach Zürich und von dort nach weiteren zwei Semestern nach Tübingen, wo ich die Diplomvorprüfung für Chemiker 1955 ablegte. In Hamburg setzte ich das Chemiestudium fort, und 1959 erhielt ich nach mündlicher Diplomprüfung und einer Diplomarbeit über Barbituryl-Aminosäuren unter der Leitung von Professor Dr. K. Heyns das Zeugnis für Diplomchemiker.

Anschließend, im Juni 1959, begann ich auf Anregung von Professor Schlubach als Gast von Professor A. Butenandt am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München mit der vorliegenden Arbeit.

